

# **Aneuploidia ja sen merkitys suusyöpävaaraa lisäävissä muutoksissa ja suusyövässä**

Iina Jalkanen  
Hammaslääketieteen kandidaatti  
Hammaslääketieteen laitos

Helsinki 20.10.2019  
Syventävien opintojen tutkielma  
Ohjaaja: professori Tuula Salo  
HELSINGIN YLIOPISTO  
Lääketieteellinen tiedekunta  
[iina.jalkanen@helsinki.fi](mailto:iina.jalkanen@helsinki.fi)

## HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty <b>Lääketieteellinen tiedekunta</b>		Laitos – Institution – Department <b>Hammaslääketieteen laitos</b>	
Tekijä – Författare – Author <b>Iina Jalkanen</b>			
Työn nimi – Arbetets titel – Title <b>Aneuploidia ja sen merkitys suusyöpävaaraa lisäävissä muutoksissa ja suusyövässä</b>			
Oppiaine – Läroämne – Subject <b>Hammaslääketiede</b>			
Työn laji – Arbetets art – Level <b>Syventävä tutkielma</b>		Aika – Datum – Month and year <b>10/2019</b>	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages <b>29</b>
Tiivistelmä – Referat – Abstract			
<p>Suun limakalvojen pintaepiteelin erilaisilla muutoksilla ja tiloilla on toisinaan taipumus malignisoitua levyepiteelikarsinoomiksi. Keinoja suusyöpävaaraa lisäävien muutosten käyttäytymisen ennustamiseen etsitään jatkuvasti, sillä vain pieni osa niistä muuttuu maligniksi. Epävarmuus maligneista muutoksista kumpuaa geneettisistä ja molekylaarisista syövän alkuprosesseista, joista tällä hetkellä ei ole riittävästi tietoa. Aneuploidian yhteyttä malignisoitumiseen on tutkittu ja sitä on ehdotettu markkeriksi suusyöpävaaraa lisäävien muutosten ennustamiseen.</p> <p>Aneuploidia tarkoittaa alle yhden kokonaisen solun kromosomiston lisäystä tai menetystä ja se kuvastaa solun kokonaisvaltaista geneettistä epätasapainoa. Aneuploidia syntyy solunjakautumisen aikaisesta virheestä, jossa kromosomit eivät erotu toisistaan oikein, mikä johtuu solusyklin tarkistuspisteiden säätelyn epäonnistumisesta. Suurien ja paljon geenejä sisältävien kromosomien aneuploidia voi aiheuttaa muutoksia tuhansien geenien ilmentämisessä ja aneuploidia itsessään voi edistää toisten kromosomien geeniekspressiota koodaamiensa transkriptiotekijöiden kautta. Genomin epästabiilitetti on kaikkien syöpien yhteinen piirre ja perustavanlaatuinen tekijä.</p> <p>Rutiinihistopatologista dysplasian määrittystä biopsiasta on kritisoitu subjektiiviseksi, suhteellisen hitaaksi ja kalliiksi menetelmäksi, joka vaatii pitkälle koulutetun patologin, joiden saatavuus ei kaikissa terveydenhuoltojärjestelmissä ole aina mahdollista. Tämän vuoksi vaihtoehtoisia, mahdollisimman objektiivisia ja luotettavia tekniikoita malignisoitumisen ennustamiseen on jo pitkään suunniteltu ja testattu.</p> <p>Aneuploidiaa pidetään lupaavana biomarkerina malignien muutosten prognostiikassa. Sitä voidaan tutkia eri menetelmillä, kuten kuva- ja virtausytometrialla sekä fluoresenssi <i>in situ</i> -hybridisaatiolla. Näistä menetelmistä kuvasytometrialla on tehty eniten aneuploidiatutkimusta ja se on osoittautunut menetelmistä sensitiivisimmäksi. Kuvasytometrian käyttöä aneuploidian määrittämisessä puoltavat monet seurantatutkimukset, joissa aneuploidialöydös suusyöpävaaraa lisäävästä muutoksesta on lisännyt malignisoitumisriskiä 3,12-kertaiseksi. Pätevin keino hallita suun potentiaalisesti maligneja muutoksia ja tiloja voisi olla säännöllinen seuraaminen, jonka frekvenssiä voitaisiin mukauttaa ploidiamäärityksen ja histopatologisen arvion perusteella. Tämä vaatii kuitenkin lisää tutkimusta aneuploidiaista sekä sen tutkimismetodien kehittämistä.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords <b>Aneuploidia, suusyöpä, suusyöpävaaraa lisäävät muutokset</b>			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

## SISÄLLYSLUETTELO

1 JOHDANTO.....	4
2 ANEUPLOIDIA.....	6
2.1 Mitä aneuploidia tarkoittaa? .....	6
2.2 Miten aneuploidiaa voidaan tutkia?.....	7
2.2.1 Automaattinen kuvasytometria.....	8
2.2.2 Virtausytometria.....	10
2.2.3 <i>In situ</i> –hybridisaatiotekniikat.....	13
2.2.4 Yhteenvetotaulukko ploidiamääritysmenetelmistä.....	15
3 SUUSYÖPÄVAARAA LISÄÄVÄT MUUTOKSET JA TILAT.....	16
3.1 Aneuploidia-analyysin soveltuvuus suusyöpävaaraa lisäävien muutosten prognostiseen arviointiin.....	18
3.1.1 Kuvasytometria DNA-ploidian määrittämisessä.....	20
3.1.2 Virtausytometria DNA-ploidian määrittämisessä.....	21
3.1.3 Kuvasytometrian ja virtausytometrian vertailua.....	22
3.1.4 Fluoresenssi <i>in situ</i> -hybridisaatio DNA-ploidian määrittämisessä.....	23
3.1.5 Fluoresenssi <i>in situ</i> -hybridisaation ja kuvasytometrian vertailua.....	24
4 POHDINTA.....	26
Lähdeluettelo.....	28

## 1 JOHDANTO

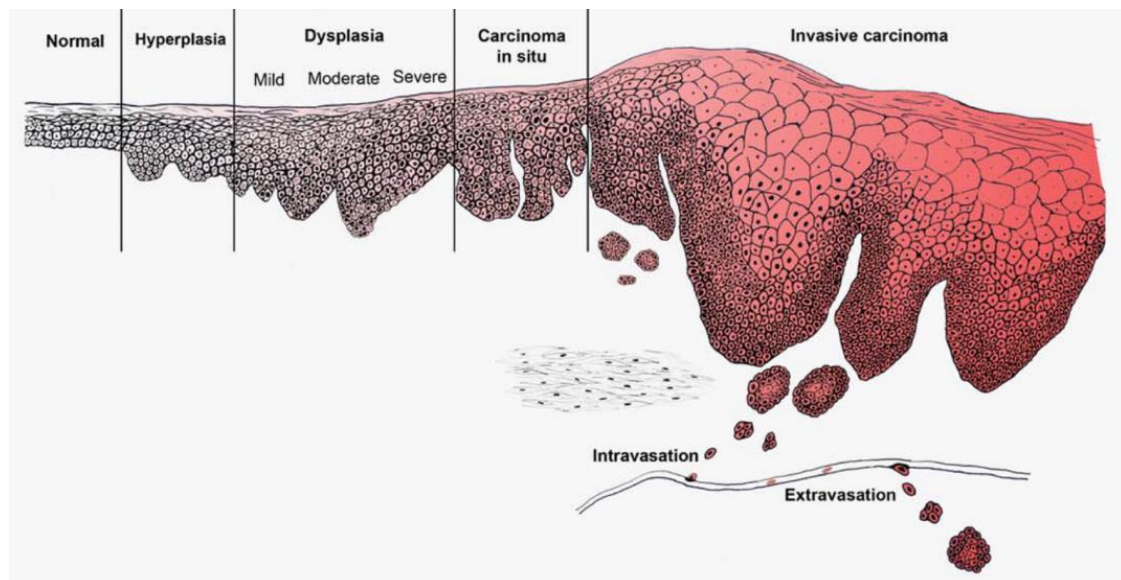
Uusia keinoja ennustaa suun levyepiteelisolujen muuttumista karsinoomasoluiksi etsitään jatkuvasti (Alaizari ym. 2017). Tällä hetkellä luotettavimpana malignien muutosten ennustavana tekijänä pidetään sytologisia ja morfologisia muutoksia epiteelin dysplasian yhteydessä, mutta toistaiseksi ei ole löydetty kliinisiä tai histopatologisia markkereita, jotka pystyisivät luotettavasti kertomaan, mitkä suun muutokset etenevät maligniksi ja mitkä eivät. (Nikitakis ym. 2018)

Suusyöväet kattavat 2 % kaikista diagnosoiduista maligneista muutoksista vuosittain (Bray ym. 2018) ja pelkästään suun levyepiteelin karsinooma todetaan yli 300 tuhannella ihmisellä joka vuosi, mikä tekee siitä yhden yleisimmistä syövästä (Nikitakis ym. 2018). Uusista tapauksista vuonna 2018 suusyöpä oli maailmanlaajuisesti 17. yleisin syöpätyyppi, joka löydettiin yli 350 tuhannelta ihmiseltä. Suusyöpään kuolee noin 177 tuhatta ihmistä vuosittain eli kaikista syöpäkuolemista se kattaa 1,9 %. (Bray ym. 2018) Vaikka diagnostiikassa on tapahtunut viime vuosien aikana huomattavaa edistystä, ei viisivuotisen ennusteen ole paljoakaan parantunut ja on edelleen noin 53-56% (Alaizari ym. 2017), mikä saattaa myös osittain johtua syöpätyypin useimmiten aggressiivisesta luonteesta (Nikitakis ym. 2018). Suun epiteelisolujen karsinoomalla on monia etiologisia tekijöitä, esimerkiksi tupakka, alkoholi, bakteeri-, virus- ja sieni-infektiot, säteily, perimä, immunosuppressio ja virheravitsemus. (Mortazavi ym. 2014)

Vaikka suusyövästä selviytyisikin, liittyy sen hoitoon monia sivuvaikutuksia, jotka vaikuttavat negatiivisesti potilaan elämänlaatuun (Nikitakis ym. 2018). Leikkaushoidon ja kemoterapian jälkeisiä tiloja voivat olla epämuodostumat leikkauksen jälkeen (Nikitakis ym. 2018), makuaistin muutokset, leukalukko, sädehoidosta aiheutuva suun limakalvojen tulehdusreaktio eli sädemukosiitti, suurten sylkirauhasten poistosta johtuva suun kuivuus, kuivuudesta usein aiheutuva suun hiivasienitulehdus eli kandidaasi sekä osteoradioneekroosi eli sädehoidon aiheuttama luukuolio. (Tarnanen ym. 2019) Syöpähoitojen negatiiviset vaikutukset ovat myös yksi syy sille, miksi primaarinen syövän ehkäisy, kuten riskitekijöiden välttäminen sekä sekundäärinen syövän ehkäisy, kuten esiastemuutosten varhainen havaitseminen ja hoito, pitäisi olla ensisijainen määränpää (Nikitakis ym. 2018).

Monet suun levyepiteelin syöväet kehittyvät suun potentiaalisesti maligneista muutoksista ja tiloista, muun muassa lichen planuksesta ja leukoplakiasta (Mortazavi ym. 2014), mutta kykymme ennustaa luotettavasti, millä muutoksilla on riski edetä maligniksi, on hyvin rajallinen (Nikitakis

ym. 2018). Suusyövän sairastuvuuden ja kuolleisuuden laskuun johtaisi todennäköisesti suun levyepiteelin karsinooman sekundäärinen ehkäisy eli korkean riskin potentiaalisesti malignien muutosten ja tilojen tunnistaminen ja hoito (Nikitakis ym. 2018). Tämä on kuitenkin osoittautunut haasteelliseksi, koska esimerkiksi dysplasian eli epiteelisolujen kasvun ja erilaistumisen poikkeavuuden läsnäolo muutoksissa, jota tarkastellaan rutiinihistopatologisissa tutkimuksissa, ei yksin välttämättä ennusta maligneja muutoksia. Enemminkin voidaan todeta, että jos mikroskoopissa ei näy dysplasiaa, se ei estä muutosten mahdollista malignia luonnetta. (Nikitakis ym. 2018) Histologisen arvioinnin ongelmana on subjektiivisuus, sillä patologiin tekemät arviot dysplasian olemassaolosta tai sen vaikeusasteesta näytteessä eivät aina ole yhteneväisiä (Alaizari ym. 2017). Tekniikkaa kritisoidaan sen huonosta toistettavuudesta ja malignien muutosten huonosta ennustavuudesta. (Ghizoni ym. 2018) Tämä on kiihdyttänyt vaihtoehtoisten tutkimusmetodien kehittämistä korkean suusyöpäriskin potilaiden löytämiseen (Alaizari ym. 2017). Kun suun potentiaalisesti maligneja muutoksia ja tiloja on arvioitu eri vertailevissa tutkimuksissa, on pystytty tunnistamaan monia kliinispatologisia piirteitä, jotka voisivat liittyä kohonneeseen riskiin muuttua maligniksi. Tämän tyyppisten objektiivisten ja luotettavasti ennustavien markkereiden löytäminen on tärkeää, jotta potentiaalisesti maligneja tiloja ja syövän taustalla piileviä molekylaarisia mekanismeja pystyttäisiin ymmärtämään paremmin. (Nikitakis ym. 2018)



Kuva 1. Suun limakalvon muutokset vaiheittain suusyöväksi. DNA-ploidia on yksi esimerkki dysplasian vaikeusasteen kanssa korreloivista molekylaarisista poikkeavuuksista. (Dionne ym. 2014)

Suun limakalvon muutos terveestä ja normaalista epiteelistä suusyöpään johtavaksi ei ole aina suoraviivaista ja siihen voivat vaikuttaa monet molekylaariset tekijät. Useimmiten muutokset tapahtuvat hitaasti, kun lukuisat molekyylitason poikkeavuudet kasaantuvat yhdistelmiksi, jotka edesauttavat malignien muutosten syntymistä. Näitä molekylaarisia poikkeavuuksia on tunnistettu useita ja moni niistä onkin niin kutsuttu syövän tunnusmerkki tai muu onkogeeninen tapahtuma. Molekylaarisia poikkeavuuksia ovat esimerkiksi DNA-aneuploidia, heterotsygoottisuuden menetys, telomeraasin aktivaatio, COX-2 -molekyylin laukaisema tulehdusreaktio, angiogeneesi, monet solusykliä ja signaalintireittejä ohjaavat molekyylit sekä epigeneettiset tapahtumat kuten histonien modifikaatio ja miRNA ja niiden toimintaa ohjaavat molekyylit. (Nikitakis ym. 2018) Tässä kirjallisuuskatsauksessa keskitytään ensimmäiseen eli DNA-aneuploidian merkitykseen ja analysointiin suusyöpävaaraa lisäävissä muutoksissa ja tiloissa.

## **2 ANEUPLOIDIA**

Seuraavissa kappaleissa selvitetään, mitä aneuploidia tarkoittaa, kuinka se syntyy ja millä menetelmillä aneuploidiaa voidaan tutkia.

### **2.1 Mitä aneuploidia tarkoittaa?**

Aneuploidia tarkoittaa alle yhden kokonaisen solun kromosomiston lisäystä tai menetystä (Potapova & Gorbsky 2017). DNA-aneuploidia aiheuttaa epätasapainoisia muutoksia solun proteomissa (Potapova & Gorbsky 2017) ja sitä pidetään kromosomaalisen epästabiiliuden indikaattorina (Ghizoni ym 2018). Käytännössä aneuploidia on seurausta virheestä kromosomien erkaantumisessa solunjakautumisen aikana ja on yleensä vahingollista sekä solulle että koko organismille. Aneuploidia itsessään voi edistää muiden kromosomien epästabiiliutta, sillä aneuploidisten kromosomien koodaamat transkriptiotekijät pystyvät muuntelemaan muiden kromosomien geeniekspressiota. Suurten ja paljon geenejä sisältävien kromosomien aneuploidia voi aiheuttaa muutoksia tuhansien geenien ilmentämisessä. (Potapova & Gorbsky 2017)

Normaalisti solu valvoo jakautumistaan niin kutsutuissa tarkistuspisteissä solusyklin eri vaiheissa. Tarkistuspisteissä solu pyrkii tunnistamaan ja korjaamaan onnistunutta jakautumistaan uhkaavat ongelmat. Jos tarkistuspisteet epäonnistuvat virheen korjauksessa ja solunjakautuminen jatkuu, on tuloksena kaksi tytärsolua, jotka ovat molemmat geneettisesti epätasapainossa yhden tai

useamman kromosomin, kromosomin palojen tai kokonaisen kromosomiston suhteen. Esimerkiksi joillakin eliölajeilla esiintyvien polyploidisten solujen kohdalla tällainen jakautuminen ei aina johda aneuploidiaan, vaan voi olla osa normaalia kehitystä. Diploidisilla soluilla tilanne on kuitenkin toinen. Kromosomien erkaantuminen vaatii kromosomien liikkeen sekä onnistuneen säätelyn solusykliissä syklin M-vaiheen aikana. Näiden pääreittien yhteistyön puutteesta syntyneen kromosomien epäonnistuneen jakotasoon siirtymisen seurauksena solulla voi olla monia kohtaloita. Mitoosin pysähtyttyä solu voi mennä suoraan apoptoosiin tai se voi poistua mitoosista kärsien kuitenkin useista poikkeavuuksista, mikä lopulta johtaa aneuploidisten solujen syntyyn. Yksi vaihtoehto on solun poistuminen mitoosivaiheesta lainkaan ilman kromosomien jakaantumista tai sytokineesiä, jolloin tuloksena on yksi tetraploidinen solu. Aneuploidisia ja tetraploidisia soluja tarkkailee p53-tuumorisuppressorigeenistä riippuva vahtijärjestelmä, joka reagoi epänormaaliin kromosomisisältöön ja kykenee pysäyttämään solusyklin, aiheuttaa solukuolemaan johtavan kaskadin tai kiihdyttämään solun vanhenemista. Jos p53-proteiinin ilmentyminen on häiriintynyt, on aneuploidisilla ja tetraploidisilla soluilla mahdollisuus aloittaa hallitsematon proliferaatio. (Potapova & Gorbsky 2017)

Suuri osa syövästä on aneuploidisia eli niillä on muutoksia kromosomirakenteessa ja -lukumäärässä (Nikitakis ym. 2018). Kromosomaalista epätasapainoa pidetäänkin kaikkien syöpien yhteisenä perustavanlaatuisena piirteenä (Alaizari ym. 2017). Aneuploidia ei kuitenkaan kerromistään tietystä geneettisestä muutoksesta, vaan se heijastelee genomien kokonaisvaltaisesta epästabiiliteetistä kumpuavia geenien muutoksia. (Nikitakis ym. 2018).

Aneuploidia on lupaava biomarkkeri malignien muutosten prognostiikassa (Nikitakis ym. 2018) ja DNA-ploidia -analyysi osoittautuu aina vain hyödyllisemmäksi diagnoosin ja prognoosin tekemisessä malignien neoplasmojen yhteydessä sekä potentiaalisesti maligneihin tiloihin liittyvien muutosten ennustamisessa (Ghizoni ym. 2018). Aneuploidia on korkean riskin non-dysplastisilta näyttävien muutosten tunnusmerkki (Alaizari ym. 2017) ja sen on havaittu olevan suun limakalvon malignien muutosten lisäksi ennustava markkeri myös ruokatorvessa, ihon melanosyyteissä, peräsuolella, paksusuolella ja kohdunkaulassa (Alaizari ym. 2017)

## 2.2 Miten aneuploidiaa voidaan tutkia?

DNA-aneuploidian tutkimiseen käytetään automaattista kuvasytometriaa, virtausytometriaa ja fluoresenssi *in situ* -hybridisaatiotekniikkaa. Metodeissa käytetyt laitteistot ja konsepti, johon

tekniikka perustuu, on esitelty seuraavissa kappaleissa.

### ***2.2.1 Automaattinen kuvasytometria***

Kuvasytometriassa kameralla varustetulla fluoresenssimikroskoopilla tallennetaan kuvattavaa aluetta solupopulaatiosta. Kuvan käsittelyllä voidaan tunnistaa solutyyppejä ja niiden ominaisuuksia. DNA-kuvasytometria on solun tumän sisällön mittaukseen käytetty optinen metodi, jolla voidaan tutkia suuriakin solumääriä eri parametrien suhteen sekunneissa. (Lu 2010)

Kuvasytometrialla on DNA-ploidian tunnistuksessa useita etuja: määrittelyyn sopivat rutiinilla tehdyt parafiinipadatut biopsiat, kudoksenäytteestä on mahdollista valita vain tietyt osat tutkimukseen, suurenkin datan kokoaminen on nopeaa (Ghizoni 2018), tekniikka on sensitiivinen (Nikitakis ym. 2018), 5c DNA-sisällön ylittävät solut pystytään tunnistamaan (Ghizoni 2018), montaa ominaisuutta voidaan analysoida samanaikaisesti ja solumateriaali säilyy ehjänä, jolloin potentiaalista informaatiota ei katoa (Lu 2010). Myös histologisessa analyysissä saatuja tuloksia voidaan verrata DNA-sisältöön sekä kromatiinirakenteeseen ja sen jakautumiseen solussa. (Abdel-Salam ym. 1988) Oikein käytettynä metodi ennustaa myös hyvin maligneja muutoksia suun limakalvolla ja suun potentiaalisesti maligneissa muutoksissa ja tiloissa. Laajempaa tekniikan käyttöönottoa on estänyt puute välineistä, joilla olisi julkistettuja tuloksia sekä riittävästi tutkimustietoa laadun takaamiseksi. (Ghizoni 2018) Metodilla soluista tutkittavien komponenttien määrää rajoittavat käytettävän laitteen erotuskyky valon spektrin suhteen ja fluoresenttien reagenssien päällekkäisyys. Myös tunnettuja kohteita voidaan ainoastaan etsiä. (Lu 2010)

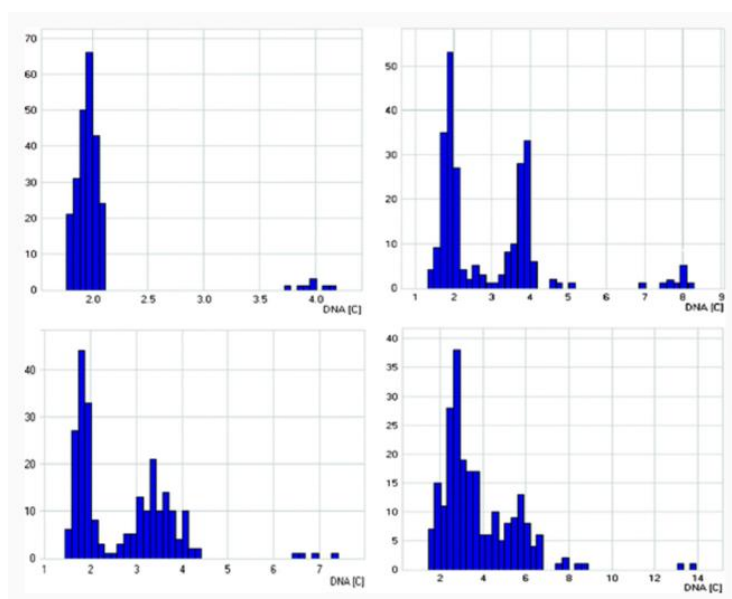
Käytännössä DNA-kuvasytometriaan on tehtävä soluista yksikerroksinen valmiste, jota voidaan tutkia kuvasytometrialaitteella. Jos veitsellä leikatusta kudoksenäytteestä halutaan tutkia DNA-sisältö, on valmiiksi formaliinifiksoidusta parafiinileikepreparaatista leikattava ensin muutamien kymmenien mikrometrien paksuinen levy. Näytteen käsittelyyn on useita tekniikoita, mutta esimerkiksi se voidaan tehdä seuraavanlaisesti: kudoksenäyte käsitellään nopeasti ksyleenillä, jonka jälkeen se kostutetaan uudelleen eri etanolipitoisuuksia sisältävien liuosten sarjassa. Sen jälkeen kudoksesta käsitellään proteaasilla kahden tunnin ajan 37 °C asteessa. Näyte pestään fosfaattipuskuroidussa keittosuolaliuoksessa, suodatetaan nailonverkkosolusuodattimen läpi ja liuotetaan uudelleen fosfaattipuskuroituun keittosuolaliuokseen. Syntynyttä seosta pipetoidaan 100 mikrolitraa sentrifugoitavaksi. Solut kerätään mikroskooppialustalle niin, että tumat saadaan yhteen kerrokseen. Solukerroksen annetaan kuivua tunnin ajan, jonka jälkeen sitä liuotetaan tunti



200 ml:ssa 5-molaarista vetykloridiliuosta (HCl), minkä jälkeen solut voidaan värjätä Feulgen-Schiff-värjäyksellä. Valmiit värjätyt yksikerroksiset soluvalmisteet voidaan skannata kuvasytometrialaitteistolla. (Dunn ym. 2010)

Tutkimukseen voidaan käyttää esimerkiksi Fairfield-nimistä automaattista kuvasytometrasta analysaattoria. Laite koostuu mikroskoopista, 546 nanometrin vihreän valon suodattimesta sekä mustavalkoisesta korkean tarkkuuden digitaalisesta kamerasta. Käsittelystä näytteestä mitataan optinen tiheys ja tumen pinta-ala. Integroitu optinen tiheys lasketaan jokaisesta tumasta ja ohjelma korjaa taustan optisen tiheyden tumien kohdalla. Segmentaatio-ohjelma valitsee kokonaiset tumat skannaamalla 1000 tumaa automaattisesti ja lajittelemalla ne eri kategorioihin solutyypin mukaan. Kuvia voi joskus olla tarpeen editoida manuaalisesti ja poistaa osittaiset ja päällekkäin olevat tumat.

Kuvasytometrian biologinen perusta on kromosomien määrälliset sekä rakenteelliset poikkeavuudet ja tarkoituksena on tunnistaa solukannat, joissa on epänormaali määrä DNA:ta. Soluista, joiden kromosomimäärä tiedetään normaaliksi, mitataan optinen tiheys, jota käytetään vertailuarvona muita soluja tutkittaessa. Tähän soveltuvat esimerkiksi lymfosyytit (Dunn ym. 2010). DNA-sisältöä ilmaistaan "c"-asteikolla, jossa 1c tarkoittaa keskimääräistä puolikasta solun sisältämästä DNA-määrästä solusyklin G0/G1-vaiheessa. DNA:ltaan aneuploidiset solulinjat, jotka ylittävät euploidian määritetyt raja-arvot, voidaan erottaa kuvasytometrialaitteistolla. Jokaisesta tutkitusta tumasta saadun integroidun optisen tiheyden perusteella voidaan tumien DNA-sisällöstä luoda histogrammi tietokoneohjelmiston avulla datan ymmärtämisen helpottamiseksi kuvan 1 tapaan. (Remmerbach, 2013)



Kuva 2. Esimerkki kuvasytometrialaitteistolla saadusta tumapopulaation DNA-sisällöstä. Pystyakselilla on mitattujen solujen määrä ja vaak akseli kuvaa c-arvoa. (Remmerbach 2013)

a) Ylävasen: DNA-histogrammi histologisesti määritetystä hyperkeratoosista, josta ei havaittu dysplasiaa.

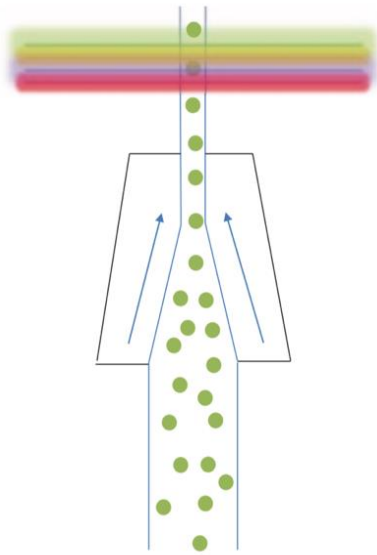
Soluilla on kuvaajan mukaan normaali 2c solulinja.

- b) Yläoikea: DNA-histogrammi diagnosoidusta lichen planuksesta (punajäkälä), josta voidaan huomata normaalit euploidiset polyploidiset solulinjat vaaka-akselin 2c ja 4c kohdalla.
- c) Alavasen: histologisesti määritetty levyepiteelin karsinooma kielessä. Soluista voidaan todeta epänormaali solulinja 1,7c ja 3,5c kohdalla, mikä viittaa aneuploidiaan.
- d) Alaoikea: potilaalta on määritetty histologisesti levyepiteelin karsinooma hammasvallissa. Epänormaalit solulinjat ovat nähtävissä histogrammissa epäselkeinä piikkeinä sekä neljän solun 9c ylittävä DNA-sisältö, joten näytteestä voidaan todeta aneuploidia.

### 2.2.2 Virtausytometria

Virtausytometria on molekylaarinen diagnostiikkamenetelmä, joka perustuu virtaavaan nesteeseen luotettuihin tutkittaviin partikkeleihin sekä fluoresenssiin. Tämä teknologia on osoittautunut varsin käteväksi fysikaalisia ominaisuuksia, pintarakenteita ja DNA-sisältöä mittaavaksi analyysimenetelmäksi, jolla voidaan tunnistaa normaaleja ja epänormaaleja solun komponentteja monista eri kudoksista sekä vertailla solunsisäisiä markkereita useissa taudeissa. Tekniikkaa käytetään monissa rutiinitestauksissa potilaan tilan tarkkailuun tai diagnoosien ja prognoosien tekemiseen ja niiden lisäksi sillä on myös monia muita käytännön sovellutuksia. (Wu 2012)

Virtausytometria on muihin manuaalisiin solun immunologian tutkimistekniikoihin verrattuna tehokkaampi, täsmällisempi ja helpommin toistettava. Tuhansien solujen virratessa joka sekunti lasersäteillä varustetun tutkan ohi, anturi kerää solujen merkkiaineiden emittoimat säteet liikkuvista soluista ja tietokone analysoi saadun datan. Virtausytometriaan tarkoitetulla ohjelmalla voidaan käsitellä tietoa liittyen esimerkiksi solujen kokoon, fenotyyppiin ja elinkelpoisuuteen ja rakentaa kerätyistä tiedoista tilastollisia malleja. Parhaimmilla nykylaitteilla voidaan mitata jopa 18 parametria samanaikaisesti ja suuriakin aineistoja saadaan analysoitua muutamissa tunneissa. (Wu 2012) Virtausytometrian huonoja puolia ovat laitteistojen kallis hinta sekä vaadittavat erityisaidot niiden käyttöön. Metodia rajoittaa myös se, että vain tunnettuja kohteita voidaan etsiä (Lu 2010). Lisäksi kiinteästä biopsianäytteestä joudutaan tekemään virtausytometriaan sopiva luos, jolloin nukleiinihappomateriaalia ja näin ollen sen sisältämää informaatiota voi kadota näytteen valmistusprosessissa. (Abdel-Salam ym. 1988)



Tyypillinen virtaussytometri koostuu kolmesta toiminnallisesta osasta: nesteenkiertokoneisto, tutkajärjestelmä ja tietokoneohjelmisto. Nesteenkiertokoneisto valvoo solujen tuloa lasersäteiden luokse niin, että vain yksi solu kerrallaan saapuu tutkaan. Tämän mahdollistavat laminaarinen virtaus sekä hydrodynaaminen keskittäminen, joista huolehtii paineistettu isotoninen puskuri. (Wu HK 2012)

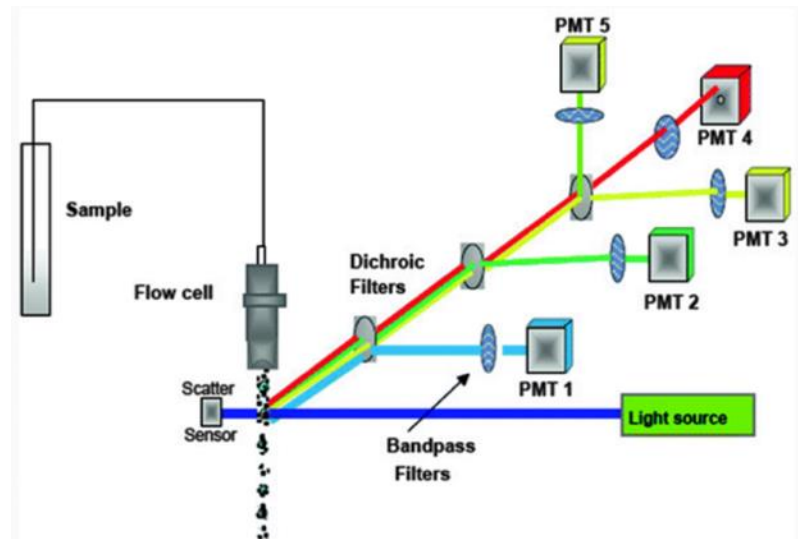
Kuva 3. Yksinkertaistettu malli virtaussytometrin tutkasta, jossa solut virtaavat yksi kerrallaan lasersäteiden läpi ja emittoivat valoa anturiin, joka kerää dataa valosignaaleista. (Goetz ym. 2018)

Tutkajärjestelmä sekä tuottaa että kokoaa virtauskammiossa käytettävät valosignaalit. Optinen systeemi sisältää lasersädelähteitä, joilla on tietty aallonpituus sekä suodattimia ja peilejä. (Wu HK 2012) Lasersäteiden on tarkoitus virittää tutkittavien solujen fluorokromiosat. Moderneimmissa virtaussytometreissa on jopa viisi virittävää laseria. Laserit nimetään emittoimansa värin mukaan: violetti 380-450 nm, sininen 450-495 nm, vihreä/keltainen 495-570 ja 570-590, punainen 620-750 nm sekä ultraviolettii 10-380 nm (Goetz ym. 2018). Tutkittavat solut on käsitelty fluorokromilla eli jollakin fluoresoivien molekylaaristen koettimien ryhmään kuuluvalla aineella, kuten esimerkiksi propidiumjodidilla tai aktinomyysiinillä. Kun fluorokromia sisältävään soluun osuu lasersäde, tapahtuu fotonien absorbointi aineeseen, minkä jälkeen fluorokromi emittoi fotonien energian lämpönä sekä alkuperäistä aallonpituutta pidempiaaltoisina fotoneina, jotka tutka havaitsee. Fluorokromeilla on niille ominainen aallonpituuksien spektri sekä absorptiomaksimi, joilla ne virittyvät maksimaalisesti. Lasersäteiden aallonpituus on siis sovitettava juuri halutulle fluorokromille. Tämä tarkoittaa, että mitä enemmän lasereita laitteella on, sitä enemmän fluoresentteja värejä voidaan mitata.

Virtaussytometrissä käytetään pitkänkantaman ja lyhyenkantaman suodattimia sekä dikrooisia peilejä, jotka asetettuna 45 asteen kulmaan jakavat eri aallonpituuksia edustavat valonsäteet eri suuntiin. Lasersäteestä 20 asteen kulmassa siroavan valon kerää FSC-linssi (forward scatter), jonka mittaama intensiteetti kertoo solun koosta. Suorassa 90 asteen kulmassa siroava valo kerätään SSC-linssillä (side scatter), joka antaa tietoa solun sisästä. Näiden kahden linssin datan yhdistämällä pystytään erottamaan solutyypit heterogeenisestä näytteestä. (Lu 2010)

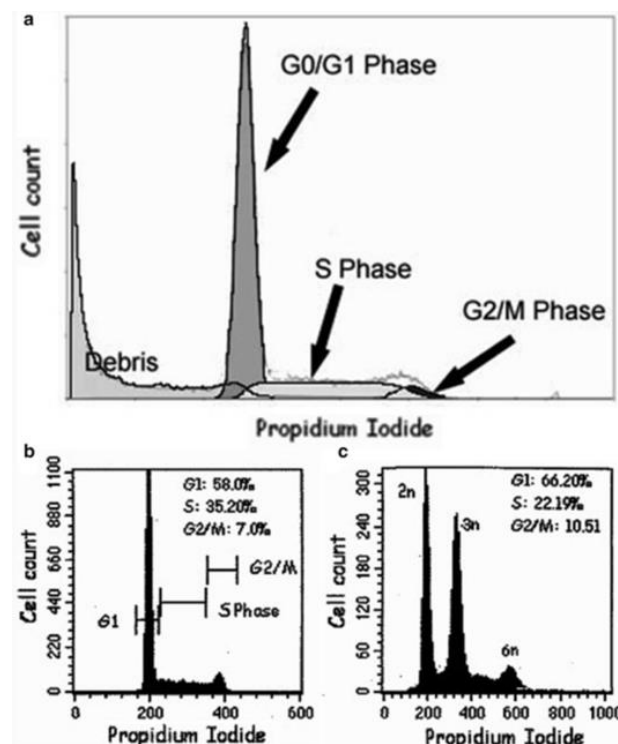
Tietokonesysteemi vastaa fotonien tuoman informaation muuntamisesta käyttäjälleen ymmärrettävään muotoon. Koneisto ottaa sisään fotoneja ja päästää ulos tuhansia fotoelektroneja. Tietokone mittaa FSC- ja SSC-linsseistä siroavan valon amplitudin, pinta-alan ja leveyden sekä pyrkii kompensoimaan fluorokromien spektrien päällekkäisyyksiä. Fotoelektronipulssin signaalia vahvistetaan ennen sen antamien arvojen muuttamista digitaalisiksi ja datan syöttämistä tietokone-ohjelmistoon. Virtaussytometrin toimintaa rajoittavat soluista tutkittavien parametrien määrä, joka määräytyy valon spektrin resoluution sekä fluorokromien päällekkäisyyksien mukaan.

(Lu 2010)



Kuva 4. Yksinkertaistettu malli tyypillisestä virtaussytometrillä. (Wu 2012)

Virtaussytometriä on hyvä työkalu DNA-sisällön analysoimiseen. Prosessi vaatii tumapopulaation värjäyksen fluoresoivalla aineella, kuten esimerkiksi propidiumjodidilla. Analyysissä solun DNA-



sisältöä verrataan normaaliksi todettuun kontrollitumaan, jolloin voidaan erotella normaalit DNA-diploidiset sekä epänormaalit aneuploidiset solut. Mittaukset perustuvat solusyklin vaiheiden pituuksien määrittämiseen. Automaattiset tietokoneohjelmat piirtävät DNA-sisällöstä histogrammin G0/G1- ja G2/M-vaiheiden maksimipisteiden variaatiokertoimelle, diploidiaprosentille, aneuploidiaprosentille ja DNA-indeksille. (Wu 2012)

Kuva 5. ModFIT- ja FlowJo-ohjelmilla tehdyt histogrammit (Wu 2012):

- a) Yhden parametrin histogrammin periaatekuva, jossa DNA-ploidia ja solusykli on määritetty propidiumjodidia käyttäen.
- b) Malli normaalista DNA-sisällöstä solusyklissä. Fluoresenssi-piikki G0/G1-vaiheelle on noin arvon 200 kohdalla ja DNA-sisältö on  $2n$  eli diploidinen. G2/M-vaiheen DNA-sisältö on  $4n$  eli kuvaajan vaaka-akselilla kohdassa 400 eli solu on normaaliin tapaan kahdentanut perimänsä solunjakautumista varten.
- c) Malli epänormaalista DNA-sisällöstä solusyklissä. Vaaka-akselin kohdassa 200 on normaali G0/G1-piikki, joka ilmaisee diploidian, mutta sen vieressä kohdassa 300 on toinen G0/G1-piikki, joka edustaa triploidiaa  $3n$ . Tästä piikistä voidaan päätellä solun aneuploidia. Lisäksi aneuploidian näkee vaaka-akselin kohdassa 600 olevasta  $6n$ -sisällöstä G2/M-vaiheessa. (Wu 2012)

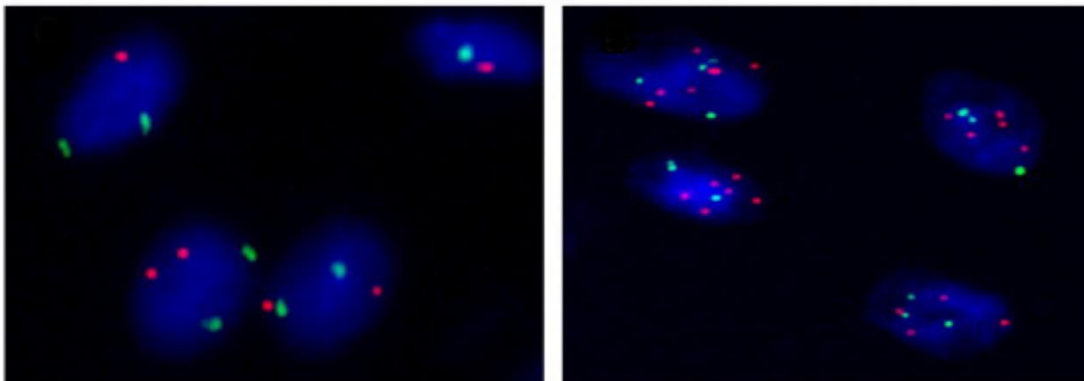
### 2.2.3 *In situ* -hybridisaatiotekniikat

Molekyyli- ja geneettisistä menetelmistä *in situ* -hybridisaatio perustuu leimatun nukleiinihappokoettimen hybridisoimiseen suoraan histologisen preparaatin spesifiseen nukleiinihapposekvenssiin, jolloin sitä voidaan tarkastella mikroskoopilla. Kun kromosomipreparaattiin hybridisoidaan fluorokromikonjugoituja nukleotideja, kutsutaan menetelmää fluoresenssi *in situ* -hybridisaatioksi (FISH). Fluoresenssin havaitsemiseksi tarvitaan epifluoresenssimikroskooppi sopivilla suodattimilla sekä tietokoneohjelmisto. Tällä sensitiivisellä metodilla saadaan tutkittua geneettistä materiaalia, johon koetin sitoutuu muodostamalla uuden DNA-kaksoiskierrteen komplementaarisen kohdemateriaalin kanssa. (Tönnies 2002) Oleellista on, ettei solun rakennetta tarvitse rikkoa, mikä tekee tekniikasta ihanteellisen kromosomien tutkimiseen, kun kaikki potentiaalinen tieto DNA:sta säilyy. Informaatiota ei katoa samalla tavalla, kuin tekniikoissa, joissa nukleiinihapot erotetaan soluista. (Abdel-Salam ym. 1988) Muiden kromosomaalisten muutosten tutkimisen ohella FISH-menetelmien yksi tärkeimmistä käyttöindikaatioista on aneuploidian tutkiminen (Wilkinson 1998).

FISH-tekniikassa koettimet leimataan useimmiten biotiinilla tai digoksigeniini-dUTP:lla. Riittävän suuren määrän leimaaminen DNA-koettimia sekä DNA:n konsentraatio ovat tärkeitä tekijöitä. Leimattujen koettimien koko on tärkeää huomioida, jotta liian suurten koettimien taustafluoresenssi ei peitä alleen haluttuja signaaleita tai että liian pienten koettimien signaalit ylipäättään näkyvät heikon fluoresenssisignaalin vuoksi. Kromosomaalinen DNA esikäsittellään poistamalla hybridisaatiota häiritsevät proteiinit. Yksinkertaisin keino hybridisoida ja havaita

kolme eri koetinta samanaikaisesti on käyttää yhtä biotiinilla leimattua koetinta, jolla saadaan punainen signaali, yhtä digoksigeniinillä leimattua koetinta (havaitaan FITC:llä ja saadaan vihreä signaali) sekä yhtä koetinta, joka leimataan erikseen sekä biotiinilla että digoksigeniinillä, jolloin saadaan keltainen signaali havaittua kaksoisvärireagensseilla. (Wilkinson 1998) Metodin käyttöä rajoittaa kapea analyysispektri, mutta toisaalta se on nopea ja sensitiivinen ja sillä voidaan tutkia jo arkistoituja näytteitä. (Tönnies 2002)

FISH-tekniikassa kudoksenäytteet ja koettimet voidaan valmistaa eri tavoin, mutta esimerkiksi Siebers ym. (2013) tutkimuksessa valmistelu on tehty näin: parafiinikäsittellyt 4 mikrometrin paksuiset kudoksenäytelevyt deparafinoidaan sekä esikäsitellään metaanihappovetyperoksidiliuoksella, natriumtiosyanaatilla sekä pepsinillä. Näytteet jälkikäsitellään 1 % formaldehydillä fosfaattipuskuroidussa keittosuolaliuoksessa ja vesi poistetaan etanoliliuosten sarjalla. Koettimet kromosomeille 1 ja 7 valmistetaan merkitsemällä ne biotiinilla ja digoksigeniini-dUTP:lla ja liuottamalla formamidissa, SSC-puskuriliuoksessa, dekstraanisulfaatissa sekä 50-kertaisessa ylimäärässä kantaja-DNA:ta. Koetinta ja kudosta denaturoidaan 5 min ajan 80 C asteessa sekä hybridisoidaan yön yli, minkä jälkeen kudoksenäytteet pestään ja koettimet tehdään havaittaviksi erilaisilla vasta-aineyhdistelmillä. (Siebers ym. 2013)



Kuva 6. Fluoresenssi *in situ* –hybridisaatiolla saadut tulokset ploidiamäärityksessä kromosomeille 1 (vihreä) ja 7 (punainen) solun tumassa (sininen). Vasemmassa kuvassa diploidia näkyy molemmilla kromosomeilla. Oikealla olevassa kuvassa näkyy kromosomien 1 ja 7 epätasapaino. (Siebers ym. 2013)

## 2.2.4 Yhteenvertaustaulukko ploidiamäärittämismenetelmistä

Taulukko 1. Yhteenvertaustaulukko aneuploidian tutkimiseen käytettyjen kolmen menetelmän ominaisuuksista.

	<b>Kuvasytometria</b>	<b>Virtaussytometria</b>	<b>Fluoresenssi <i>In situ</i> - hybridisaatio</b>
<b>Menetelmän toimintaperiaate</b>	Kameralla varustetulla fluoresenssimikroskooppilla solujen yksikerroksisen valmisteen kuvaaminen	Virtaavien solujen fluorokromiosien laserilla virittäminen ja niiden emittoiman säteilyn mittaus	Nukleotidikoettimen hybridisaatio histologiseen preparaattiin ja tarkastelu mikroskooppilla
<b>Menetelmän edut</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Suurten määrien nopea analysointi</li> <li>- Sensitiivinen</li> <li>- Solumateriaali säilyy ehjänä</li> <li>- Monen ominaisuuden analysointi samanaikaisesti</li> <li>- Rutiiniparafiinileikkien käyttö mahdollista</li> <li>- Kudosnäytteestä on mahdollista valita tietyt osat tutkimukseen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Suurten määrien nopea analysointi</li> <li>- Monen ominaisuuden analysointi samanaikaisesti</li> <li>- Automaattinen solujen jaottelu</li> <li>- Helppo toistettavuus</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nopea ja sensitiivinen metodi</li> <li>- Solumateriaali säilyy ehjänä</li> <li>- Voidaan käyttää arkistoituja näytteitä</li> </ul>
<b>Menetelmän rajoitukset</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Laitteen erotuskyky valon spektrin suhteen</li> <li>- Fluoresoivien reagenssien päällekkäisyys</li> <li>- Vain tunnettuja kohteita voidaan etsiä</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Laitteen erotuskyky valon spektrin suhteen</li> <li>- Fluoresoivien reagenssien päällekkäisyys</li> <li>- Vain tunnettuja kohteita voidaan etsiä</li> <li>- Kiinteästä solumateriaalista joudutaan tekemään liuos, jolloin DNA-materiaalia menetetään</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Kapea analyysispektri</li> </ul>

### 3 SUUSYÖPÄVAARAA LISÄÄVÄT MUUTOKSET JA TILAT

Monet suun levyepiteelisolujen karsinoomat kehittyvät potentiaalisesti maligneista suun muutoksista ja tiloista. Useat suun epiteelin muutokset luetaan osaksi moninaista muutosten ja tilojen joukkoa. Maailman terveysjärjestö WHO on määritellyt potentiaalisesti malignit muutokset ja tilat niin, että kyseisellä muutoksella on mahdollisuus malignisoitua joko tulevaisuudessa tai jo diagnoosihetkellä. (Mortazavi ym. 2014) Taulukossa 2 on listattuna suun potentiaalisesti maligneja muutoksia ja tiloja.

Suun potentiaalisesti maligneja muutoksia ja tiloja havaitaan maailmanlaajuisesti noin 2 %:lla ihmisistä. Suusyöpävaaraa lisäävien muutosten riski edetä suun epiteelin karsinoomaksi on 1,36%. (Alaizari ym. 2017) Suun potentiaalisesti malignien muutosten ja tilojen merkitys piilee niiden riskissä muuntautua levyepiteelin karsinoomaksi, minkä vuoksi niiden havaitseminen ja onnistunut hoito voisivat mahdollisesti auttaa ehkäisemään maligneja muutoksia.

Taulukko 2. Suusyöpävaaraa lisäävät muutokset ja tilat (Mortazavi ym. 2014)

Suusyöpävaaraa lisäävä muutos	Suusyöpävaaraa lisäävä tila / sairaus
Leukoplakia	Lichen planus (punajäkälä)
Erytroplakia	Diskoidi lupus erythematosus
Proliferatiivinen verrukoottinen leukoplakia	Epidermolysis bullosa
Viadent leukoplakia	Verrukoottinen ksantooma
Candida leukoplakia	Käänteishyljintä
”Reverse smoking” -tupakointitapaan liittyvä keratoosi	Aktiininen keiliitti
Verrukoottinen hyperplasia	Xeroderma pigmentosum
Synnynnäinen dyskeratoosi	Tertiaarinen syfilis
Aktiinkeiliitti	Plummer-Vinsonin syndrooma
Keratoakantooma	Virheravitsemus
Oraalinen submukoosi fibroosi	A-, B-, ja C-vitamiinien vaje
	Immunosuppressiiviset taudit (AIDS)



Suun limakalvon muutoksia arvioidaan tällä hetkellä epiteelin dysplasian sekä sen yhteydessä olevien sytologisten ja morfologisten muutosten perusteella. Niiden avulla pyritään myös ennustamaan maligneja muutoksia. (Nikitakis ym. 2018) Tähän asti biopsioita on tutkinut pitkälle koulutettu patologi, joka on määrittänyt mahdollisen sairauden asteen lievästä vaikeaan. Tämän menetelmän ongelma on kuitenkin subjektiivisuus, sillä tutkimuksen toistettavuus kenellä tahansa patologilla ei ole niin hyvä kuin voisi toivoa. Lisäksi patologien saatavuus voi olla hankalaa sekä kallista. Tämä pätee varsinkin kehittyviin maihin. (Alaizari ym. 2017) Lisäksi dysplasia yksinään ei suoraan tarkoita malignien muutosten ilmaantumisesta (Nikitakis ym. 2018) eli olisi hyvä saada toinenkin täydentävä tai itsenäinen luotettava markkeri. Ploidia-analyysi voisi olla ratkaisu ongelmaan, sillä menetelmää pidetään objektiivisena sen perustuessa automaattiseen analyysiin sekä ploidialuokittelun tarkkoihin raja-arvokriteereihin (Alaizari ym. 2017).

Suusyöpävaaraa lisäävien muutosten estäminen ja hoito kuuluvat ensisijaisesti syövän ehkäisyyn (Awadallah ym. 2018). Suusyövän ja sen vaaraa lisäävien muutosten ehkäisyssä on samoja piirteitä. Suusyöpää ehkäistään ensisijaisesti tupakoimattomuudella ja alkoholin käytön vähentämisellä sekä etenkin niiden yhteiskäytön välttämällä (Tarnanen ym. 2019). Myös joidenkin suusyöpävaaraa lisäävien muutosten riski muuttua maligniksi kasvaa entisestään tupakoivilla ja alkoholia käyttävillä (Awadallah ym. 2018). Virheravitsemus on luokiteltu Mortazavin ym. (2014) mukaan suun potentiaalisesti maligniksi tilaksi. Suusyövän ehkäisyyn kuuluukin terveellinen ja monipuolinen ruokavalio kuten tuoreet hedelmät, raat vihannekset ja kala, kun taas prosessoidut liharuoat saattavat lisätä suusyöpävaaraa (Tarnanen ym. 2019). HPV-infektion on todettu aiheuttavan suusyöpää (Tarnanen ym. 2019). HPV:n eli papilloomaviruksen ja suun potentiaalisesti malignien muutosten ja tilojen yhteydestä ollaan käyty paljon keskustelua ja saatu viitteitä siitä, että niiden välillä on korrelaatiota (Awadallah ym. 2018). Myös kroonisen hiivasienitulehduksen, alkoholipitoisten suuvesien sekä pitkään jatkuvan mekaanisen ärsytyksen on todettu aiheuttavan suusyöpää (Tarnanen ym. 2019). Silti monet suusyöpävaaraa mahdollisesti lisäävät muutokset sekä suusyövät ilmaantuvat ilman mitään tunnistettuja riskitekijöitä, mikä kertoo suusyövän etiologian puutteellisesta tietämyksestä. (Dionne ym. 2014)

Suusyöpävaaraa lisäävien muutosten hoitoon ja hallintaan käytetään kirurgiaa, kemopreventiota ja säännöllistä seuraamista. Invasiivisia menetelmiä ovat perinteinen leikkaus, kryokirurgia ja hiliidioksidilaserablaatio. Kirurgisiin toimenpiteisiin ryhdyttäessä arvioidaan potilaan riskiä saada maligneja muutoksia, joihin vaikuttavat ikä, sukupuoli ja elintavat, sekä muutoksen riskitekijöitä, kuten luokitusta, kokoa ja morfologiaa. Konservatiivisiin metodeihin lukeutuvat muutoksen

säännöllinen tarkkailu sekä kemopreventio, kuten esimerkiksi retinoidit ja epidermaalisten kasvutekijöiden reseptoriantagonistit ja -inhibiittorit. Kemopreventiossa käytetään yhdisteitä, jotka on suunniteltu estämään maligneja muutoksia tai ne voivat aiheuttaa muutoksen häviämisen tai taantumisen ja kasvattaa malignisoitumisen kynnystä suun potentiaalisesti maligneissa muutoksissa ja tiloissa. Esimerkiksi oraalista submukoosia fibroosia sekä lichen planusta voidaan lääkittää kortikosteroideilla. Lisäksi suusyöpävaaraa lisäävien muutosten hoitoon voidaan käyttää tilanteesta riippuen paikallisia A-vitamiinijohdoksia, syklosporiineja tai hivenainelisiä. (Awadallah ym. 2018) Toistaiseksi mikään kemopreventiivinen yhdiste ei ole todistetusti antanut tehokasta ja jatkuvaa suojaa suusyöpävaaraa lisääviä muutoksia vastaan ja niillä on lisäksi havaittu olevan sivuvaikutuksia. Rajoittunut ymmärryksemme karsinogeneesiä edistävästä molekylaarisista prosesseista ja vähäiset keinomme kohdistaa hoitoja tiettyihin geneettisiin ja epigeneettisiin tapahtumiin ovat osa syytä, miksi muutosten hallinta ei tällä hetkellä ole riittävän tehokasta. Uudet tutkimukset suun muutosten pitkäaikaisesta hallinnasta ovat välttämättömiä ymmärryksemme lisäämiseksi. (Nikitakis ym. 2018)

### **3.1 Aneuploidia-analyysin soveltuvuus suusyöpävaaraa lisäävien muutosten prognostiseen arviointiin**

Potentiaalisesti maligneja suun limakalvojen muutoksia ja tiloja tutkittaessa on havaittu, että DNA-aneuploidian esiintyvyys on selvästi yhteydessä vaikeaan dysplasiaan sekä korkean riskin ei-dysplastisiin muutoksiin. (Alaizari ym. 2017)

Alaizari ym. (2017) tekemässä meta-analyysissä, jota käsitellään taulukossa 3, arvioidaan DNA-aneuploidian toimivuutta markkerina malignisoitumiselle suun potentiaalisesti maligneissa muutoksissa ja tiloissa. Meta-analyysi koottiin käymällä läpi satoja artikkeleita, joiden kelpaavuutta meta-analyysiin arvioitiin. Lopulta aineistoksi saatiin viisi tarpeeksi laajaa ja kattavaa tutkimusta, joista jokainen oltiin tehty kuvasytometrialla. Tiedot tutkimuksista yhdistettiin, jolloin aineisto oli laajuudeltaan 528 tapausta. Analyysin perusteella aneuploidisilla näytteillä havaittiin olevan 3,12-kertainen riski syöväksi kehittymiseen diploidisiin näytteisiin verrattuna. Kuitenkin analyysissä huomattiin, että tutkimuksessa diploidiksi eli normaaliksi määritelty DNA-sisältö ei osoittanut maligneja muutoksia 82% todennäköisyydellä aneuploidisiin verrattuna. Tämä tarkoittaa, että DNA:ltaan diploidisissa soluissa muutoksia ilmeni noin 20 prosentilla näytteistä. Tulos voi johtua esimerkiksi epätarkasta ploidiatutkimusmetodista, jolla ei olla pystytty havaitsemaan kaikista pienimpiä kromosomaaliseen instabiliteettiin liittyviä tunnus-

Taulukko 3. Aneuploidian tutkimisen analyysimenetelmät ja niiden käytöstä saadut tulokset.

	<b>Kuvasytometria</b>	<b>Virtaussytometria</b>	<b>Fluoresenssi In situ - hybridisaatio</b>
<b>Aineisto</b>	Alaizari ym. 2017: 528 tapausta: potilaita, joilla oli kliinisesti epäilyttäviä lima- kalvomuutoksia, leukoplakioita tai dysplastisia muutoksia	Brouns ym. 2012: 41 leukoplakiapotilasta	Siebers ym. 2013: 102 leukoplakia- potilasta
<b>Muutoksen seuranta-aika</b>	Vähintään 6 kk	12-87 kk	6-246 kk
<b>Diploidiset näytteet</b>	369 kpl	38 kpl	85 kpl
<b>Aneuploidiset näytteet</b>	159 kpl	3 kpl	17 kpl
<b>Ei- malignisoituneet aneuploidiset</b>	76 kpl	3 kpl	9 kpl
<b>Malignisoituneet aneuploidiset</b>	73 kpl	0 kpl	8 kpl
<b>Malignisoituneet diploidiset</b>	≈ 74 kpl (20 % malignisoitumisriski)	2 kpl	8 kpl
<b>Syöväksi etene- misen riski aneu- ploidisilla näyt- teillä verrattuna diploidisiin</b>	3,12-kertainen	aineisto ei sovellu tilastolliseen analyysiin sen pienen otoksen ja lyhyen seuranta-ajan vuoksi	5,01-kertainen
<b>Tutkimuksen yhteenveto</b>	Aneuploidia kasvattaa malignien muutosten mahdollisuutta	Aneuploidian ja dysplasian välillä on tilastollisesti merkittävää korrelaatiota	Aneuploidia on itsenäinen markkeri, joka antaa lisätietoa dysplasiatutki- muksen ohella
<b>Tekniikan yhteenveto</b>	Kuvasytometrialla tutkittuna aneuploidia on itsenäinen maligneja muutoksia ennustava markkeri	Virtaussytometrialla tutkittaessa aneuploidiset suusyöpävaaraa lisäävät muutokset olivat 5,3 kertaa todennäköisemmin kohtalaisten tai vaikeiden muutosten yhteydessä	Aneuploidian tutkiminen FISH:llä parantaa muutosten malignin potentiaalin arviointia

*Huomautus: Taulukko on koottu tutkimuksista, jotka Alaizari ym. (2017) on tiettyjen kriteerien perusteella sisällyttänyt meta-analyysiinsä. Mikään virtaussytometrialla tehty tutkimus ei täyttänyt näitä kriteereitä ja yksi FISH:lla tehty tutkimus täytti kriteerit. Virtaussytometrialla ei olla tehty Brouns ym. 2012 lisäksi muita seurantatutkimuksia. Näin ollen virtaussytometrialla tehtyä tilastolliseen analyysiin sopivaa näyttöä ei ole aneuploidisten ja diploidisten näytteiden vertailusta syöväksi etenemisen näkökulmasta.*

merkkejä. Lopuksi meta-analyysin tuloksen luotettavuutta arvioitiin tilastollisesti. Vaikka mukana on voinut olla vääriä negatiivisia, tuloksen luotettavuus oli kuitenkin sitä luokkaa, että voitiin todeta DNA-aneuploidian olevan hyvä markkeri korkean riskin muutosten tunnistamisessa. (Alaizari ym. 2017)

Nikitakis ym. (2018) katsauksessa nostetaan esiin tutkimus, jossa on arvioitu DNA-aneuploidian ja dysplasian korrelaatiota kahdessa suuressa suun potentiaalisesti malignien muutosten ja tilojen populaatiossa, joissa ollaan käytetty kahta erilaista virtausytometritekniikkaa. Aneuploidian esiintyvyys oli vahvasti kytköksissä dysplasian kanssa. DNA:ltaan aneuploidinen näyte oli myös dysplastinen 2,6 kertaa todennäköisemmin. (Nikitakis ym. 2018)

Saman katsauksen toisessa tutkimuksessa arvioitiin aneuploidian yhteyttä dysplasian tasoon suun potentiaalisesti maligneissa muutoksissa ja tiloissa. Dysplasiaa arvioitiin neljällä tasolla, jotka olivat: ei dysplasiaa, lievä dysplasia, kohtalainen dysplasia ja vaikea dysplasia. Analyysin tulos osoitti, että aneuploidiset muutokset olivat 5,3 kertaa todennäköisemmin samasta näytteestä kuin histopatologisesti arvioitu kohtalainen tai vaikea-asteinen dysplasia. DNA-aneuploidia oli myös yhteydessä lyhyempään aikaan, jonka sisällä muutos malignisoitui. (Nikitakis ym. 2018)

Katsauksessa voitiin todeta, että DNA-aneuploidia on lupaava itsenäinen biomarkkeri potentiaalisesti malignien muutosten ennustajana. (Nikitakis ym. 2018)

### ***3.1.1 Kuvasytometria DNA-ploidian määrittämisessä***

DNA-kuvasytometrian kykyä määrittää aneuploidiaa on Ma ym. (2014) tutkimuksessa mitattu vertaamalla harjausbiopsialla otettuja ja kuvasytometrialla analysoituja tuloksia perinteiseen invasiiviseen veitsellä tehtävään kudosisopsiaan. Näytteet kerättiin 52 koehenkilöltä ensin näytteenottoharjalla vähintään 3 kertaa harjaa pyöräyttäen ja sen jälkeen läheltä harjauskohtaa otettiin tavallinen kudosisopsia veitsellä. Harjausnäytteille tehtiin DNA-kuvasytometria -analyysi ja patologi arvioi leikatut kudosisnäytteet. Tässä tutkimuksessa histologista arviointia pidettiin standardina, johon kuvasytometrian tuloksia verrattiin. Tulokset ovat taulukossa 4.

Tutkimuksen tulokset kertovat, että harjausbiopsianäytteistä tutkitun ploidian sensitiivisyys DNA-kuvasytometrialla oli 86,36 % ja spesifisyys 90,0 %. Menetelmä määrittä histologisesti vaikeaksi dysplasiaksi tai neoplasiaksi arvioidut näytteet 86,36% todennäköisyydellä aneuploidisiksi.

Histologisesti normaaliksi soluksi tai lieväksi dysplasiaksi määritetyt näytteet havaittiin DNA-kuvasytometrialla 90 % todennäköisyydellä euploidisiksi. Histopatologiseen tutkimukseen verrattuna vääriä positiivisia havaintoja oli 13,64 % ja vääriä negatiivisia 10 %. Nämä voivat johtua esimerkiksi jakautuvien solujen päällekkäisyydestä tai tulehdustilasta.

Taulukko 4. Harjausbiopsialla kerätyt ja kuvasytometrialla tutkitut näytteiden sekä samoista muutoksista otetut histologiset leikkeet. (Ma ym. 2014)

	<b>DNA-kuvasytometrialla havaittu aneuploidia</b>	<b>DNA-kuvasytometrialla havaittu euploidia</b>
<b>Histologisesti määritetty vaikea dysplasia tai neoplasia</b>	19 kpl	3 kpl
<b>Histologisesti määritetty normaali solu tai lievä dysplasia</b>	3 kpl	27 kpl

Euploidia = normaali DNA-sisältö eli DNA diploidi solu tai DNA polyploidi jakautuva solu

Yhteenvetona tutkimuksesta voitiin todeta, että harjausbiopsialla näytteen kerääminen ja DNA-kuvasytometrialla analysoiminen on hyvin sensitiivinen ja spesifinen menetelmä ja sitä voidaan käyttää malignien muutosten havaitsemiseen suun epiteelistä. (Ma ym. 2014) Lisäksi Ma ym. (2014) tutkimuksessa korostetaan harjausbiopsian käytännöllisyyttä ja helppoutta noninvasiivisena tekniikkana. Suun limakalvon muutoksien aikainen diagnosointi on vaikeaa, kun limakalvo näyttää kliinisesti normaalilta, vaikka todellisuudessa potentiaalisesti maligneilla suun muutoksilla ja tiloilla piilee vaara edetä dysplasiaksi tai karsinoomaksi. Suun alueen muutos voi olla hyvin harmittoman näköinen, jolloin potilaan kynnys epämiellyttävään invasiiviseen kudosisopsiaan suostumiseen kasvaa. Harjausbiopsia on kivuton menetelmä, jolloin hoitomyöntyvyys on korkeampi eli potilas haluaa todennäköisemmin biopsian viattomankin näköisestä muutoksesta. (Ma ym. 2014)

### **3.1.2 Virtaussytometria DNA-ploidian määrittämisessä**

Brouns ym. (2012) selvittivät retrospektiivisellä seurantatutkimuksellaan 41 leukoplakiapotilaan biopsianäytteistä DNA-ploidiaa. Arkistoiduista formaliinifiksatuista parafinipedatuista näytteistä valmistettiin luos, joka värjättiin virtaussytometriaa varten. Tietokoneohjelmiston avulla histogrammeja analysoimalla tumat määritettiin joko diploidisiksi tai aneuploidisiksi DNA-indeksin mukaan. Virtaussytometrialla määritettiin 38 näytettä diploidisiksi ja kolme näytettä

aneuploidisiksi. Verrattaessa ploidiatutkimusta histopatologiseen tutkimukseen, jokainen aneuploidiseksi määritetty leukoplakia oli myös histopatologisesti dysplastinen. Dysplastisista näytteistä 18 % oli aneuploidisia, mutta kaikista näytteistä yhteensä aneuploidisten osuus oli 7 %. Kahdella potilaalla kehittyi seurannan aikana suusyöpä, mutta heidän näytteensä havaittiin virtaussytometrialla diploidisiksi.

Taulukko 5. Histopatologinen arvio ja leukoplakianäytteiden ploidiatutkimustulos 41 potilaalla. (Brouns ym. 2012)

	Diploidinen leukoplakia	Aneuploidinen leukoplakia
<b>Ei epiteelin dysplasiaa</b>	21	-
<b>Lievä tai kohtalainen epiteelin dysplasia</b>	11	3
<b>Vaikea epiteelin dysplasia</b>	6	-

Pätevien tilastollisten päätelmien tekoon potilaiden määrän tutkimuksessa olisi pitänyt olla suurempi ja mahdollisesti myös seuranta-ajan pitempi. Tutkimuksessa virtaussytometrialla ei pystytty erottamaan leukoplakioita, jotka myöhemmin malignisoituivat. Toisaalta metodilla havaittiin korrelaatioita dysplasian ja aneuploidian välillä. (Brouns ym. 2012)

### 3.1.3 Kuvasytometrian ja virtaussytometrian vertailua

DNA-kuvasytometriaa ja DNA-virtaussytometriaa pidetään hyvinä tekniikoina rutiinianalyyseihin (Alaizari ym. 2017) Automaattista kuvasytometriaa ja virtaussytometriaa on verrattu keskenään metodien tarkkuuden ja toimivuuden kannalta. Brouns ym. (2012) tutkimuksen kohteena olivat leukoplakiat ja niiden malignit muutokset. Leukoplakiaa on koitettu ennustaa epiteelin dysplasioiden, homogeenisyyden sekä muutoksen koon perusteella, mutta myös ploidiamääritystä on esitetty hyväksi keinoksi mitata ennustetta muutoksille. Tutkimuksessa oli 41 leukoplakiapotilasta, joiden parafiinipeditut ja formaliinifiksatus näytteet arvioitiin histopatologisesti sekä DNA-kuvasytometrialla ja DNA-virtaussytometrialla. Kuvasytometrialla osoitettiin 17 leukoplakian olevan diploidisia ja 19 leukoplakiaa oli aneuploidisia. Virtaussytometrialla saatiin diploidisten näytteiden osuudeksi 38 kappaletta, kun taas aneuploidisia oli kolme. Vain kaksi muutosta tunnistettiin molemmilla metodeilla aneuploidisiksi. Yksi muutos oli virtaussytometrialla aneuploidinen ja kuvasytometrialla diploidinen. (Brouns ym. 2012)

Kaikkia näytteitä tutkittiin myös histopatologisesti. Virtaussytometrialla aneuploidisiksi tunnistetuista kaikista kolmesta näytteestä voitiin todeta dysplasiaa lievistä kohtalaiseen. Kuvasytometrialla aneuploidisiksi havaituista näytteistä (19 kpl) kahdeksan näytettä ei osoittanut merkkejä dysplasiasta, kuudessa näytteessä oli lievä tai kohtalainen dysplasia ja viisi näytettä oli vaikeasti dysplastisia. (Brouns ym. 2012)

Tuloksia arvioidessa on kyseenalaista, oliko histopatologinen arviointi edustanut hyvin koko muutosta, mutta sama epävarmuus koskee silti myös kuva- ja virtaussytometriaa. Myös eri näytteiden valmistustekniikat sekä virtaussytometrian herkkyyden aleneminen epiteelisolujen osuuden ollessa pieni voisivat selittää aneuploidisiksi tunnistettujen näytteiden määrien suurta eroa. Yksi näyte kuitenkin todettiin virtaussytometrialla aneuploidiseksi, mutta diploidiseksi kuvasytometrialla. Tätä voisi selittää tumien tarttuminen toisiinsa virtaussytometriassa, jolloin saadaan väärä positiivinen tulos. Kuvasytometriassa tältä voidaan välttyä visuaalisessa tarkastelussa. (Brouns ym. 2012)

Tässä tutkimuksessa kaksi leukoplakiaa eteni suun levyepiteelin karsinoomaksi. Molemmat havaittiin virtaussytometrialla DNA-diploidisiksi, mutta kuvasytometrialla DNA-aneuploidisiksi. Tämä viittaa siihen, että kuvasytometria olisi sensitiivisempi ja kliinisesti relevantimpi kuin virtaussytometria. Tarpeeksi usealle tutkimuksen potilaalle ei kuitenkaan kehittynyt syöpää, joten näitä päätelmiä DNA-ploidia ja malignien muutosten suhteesta ei voida tilastollisesti pitää täysin pätevänä. (Brouns ym. 2012)

### **3.1.4 Fluoresenssi *in situ* -hybridisaatio DNA-ploidian määrittämisessä**

Fluoresenssi *in situ* -hybridisaatio (FISH) on vaihtoehtoinen tapa tutkia yksittäisten kromosomien toistojaksojen muutoksia tietyissä lokuksissa. Monet fluoresenssi *in situ* -hybridisaatiotutkimukset kromosomeilla 1 ja 7 osoittavat, että kromosomipoikkeavuudet korreloivat levyepiteelisolujen karsinooman kanssa suun potentiaalisesti maligneissa muutoksissa ja tiloissa. Tutkimuksissa on todettu, että kahdella tutkimusmenetelmällä tutkittu kromosomien instabiliteetti on itsenäinen prognostinen markkeri histopatologisen diagnoosin rinnalla. (Siebers ym. 2013)

Siebers ym. (2013) tutkivat 102 leukoplakiapotilaan arkistoituja näytteitä retrospektiivisessä tutkimuksessa. Vähimmäisseuranta-aika oli 6 kuukautta ensimmäisestä leukoplakia diagnoosista muutokselle, josta otettiin biopsia ja selvitettiin DNA-ploidia. Toinen ploidiamääritys tehtiin

karsinoomaksi edenneistä leukoplakioista, joita diagnosoitiin 16 kpl. Fluoresenssi *in situ* -hybridisaatiolla analysoitiin 85 diploidista ja 17 aneuploidista leukoplakiaa. Aneuploidisista 17 leukoplakiasta kahdeksan malignisoitui ja diploidisiksi määritellyistä 85 näytteestä myös kahdeksan malignisoitui. Tässä tutkimuksessa aneuploidinen tulos muuttui maligniksi siis 47,1 % todennäköisyydellä. Muista samankaltaisista tutkimuksista on saatu vastaavia tuloksia. (Siebers ym. 2013)

Taulukko 6. Fluoresenssi *in situ* -hybridisaatiolla määritetty plidiastatus ja histopatologinen arviointi. Muutos oli hyvin paljon todennäköisemmin aneuploidinen, jos sen dysplasian aste oli määritetty kohtalaiseksi tai vaikeaksi. (Siebers ym. 2013)

	Diploidia	Aneuploidia
<b>Hyperplasia tai lievä dysplasia</b>	74	8
<b>Kohtalainen tai vaikea dysplasia</b>	11	9

### 3.1.5 Fluoresenssi *in situ* -hybridisaation ja kuvasytometrian vertailua

Siebers & ym. tutkimuksessa vertaillaan kuvasytometrialla ja fluoresenssi *in situ* -tekniikalla saatuja tuloksia suun leukoplakianäytteissä. Potilaita oli 102 ja kaikilta tutkittiin kromosomit 1 ja 7 biopsianäytteistä ensimmäisen leukoplakiadiagnoosin yhteydessä sekä karsinoomaksi kehittyneiden leukoplakoiden kohdalla. Parafiinikäsittelystä kudoksenäytelevystä leikattiin levyjä, joista ensimmäinen ja viimeinen leike värjättiin hematoksyliinivärjäyksellä ja vietin patologin analyysiin. Näiden leikkeiden välistä otettiin leikkeet kuvasytometria-analyysiin sekä toiset leikkeet FISH-analyysiin. Näin lisättiin eri menetelmien täsmällisyyttä. Värjätyt solunäytelevyt analysoitiin vihreällä suodattimella varustetulla mikroskoopilla. Kuvasytometria-analyysi tehtiin sokkona ja kaksi eri kokenutta analysoijaa luokittelivat DNA-ploidiahistogrammit. Jos enemmän kuin 5c DNA:ta sisältävien tumien määrä ylitti 1% kaikista solujen määrästä, luokiteltiin histogrammi aneuploidiseksi. Aneuploidiseksi luokiteltiin myös, jos histogrammissa oli selvä piikki 2c- tai 4c-kohtien ulkopuolella. Muutos määriteltiin tetraploidiseksi, jos 4c ylittävien tumien määrä oli 10 % soluista. (Siebers ym. 2013)



Tuloksissa havaittiin metodien välillä huomattavaa yhtäpitävyyttä. Kuvasytometriä paljasti aneuploidiseksi 23 näytettä ja diploidiseksi 79 näytettä 102 näytteestä. Vastaavasti FISH-teknikalla määritettiin aneuploidiseksi 17 ja diploidiseksi 85 näytettä. Myöhemmin kuvasytometrialla aneuploidiseksi määritellyistä näytteistä kymmenen 23:sta ja FISH:lla aneuploidiseksi määritellyistä näytteistä kahdeksan 17:stä eteni maligniksi. Diploidisiksi määritellyistä näytteistä vain kuusi 79:stä ja kahdeksan 85:stä näytti malignisoitumisen merkkejä. Malignisoitumisriskit olivat aneuploidisilla siis 43,5 % ja 47,1 % kuvasytometrialla ja FISH:llä määritettynä, mutta diploidisilla vastaavasti 7,6 % ja 9,4 %. (Siebers ym. 2013)

Tilastollisin analyysimenetelmin voitiin päätellä, että aneuploidisilla muutoksilla on kohonnut riski muuttua maligniksi. Lisäksi tutkimuksessa voitiin todeta, että kromosomaalisen epätasapainon tutkiminen kuvasytometrialla tai FISH-teknikalla on histopatologisen tutkimuksen ohella hyvä ja itsenäinen lisä diagnoosin tekemisessä. (Siebers ym. 2013)

Tutkimuksessa kolme varhaista malignisoitumisvaarassa olevaa tilaa määritettiin kuvasytometrialla diploidisiksi, mutta FISH-teknikalla aneuploidisiksi. Selitys tälle voisi olla luokitteluvirhe tai kuvasytometrian kykenemättömyys havaita pieniä aneuploidisia alapopulaatioita biopsianäytteistä jopa vähemmän sensitiivistä tapaa käytettäessä. Fluoresenssi *in situ* –hybridisaatiolla puolestaan havaittiin kaiken kaikkiaan kuvasytometriaa vähemmän aneuploidisia näytteitä, mikä tarkoittaa tekniikan huonompaa sensitiivisyyttä malignien muutosten ennustamisessa. Tätä voidaan kuitenkin selittää luokitteluvirheellä tai sillä, että FISH:lla arvioidaan ainoastaan kahden sentromeerikoettimen toistojaksojen muutoksia. (Siebers ym. 2013)

Leukoplakioden luokittelu molempien, histopatologisen analyysin sekä kromosomien instabiliteettianalyysin, perusteella kolmeen alalajiin voisi johtaa potilaiden soveltuvampaan hoitoon. Siebers ym. (2013) tutkimustulokset malignisoitumisen suhteen viittaavat aneuploidian lievän dysplasian yhteydessä olevan verrattavissa diploidiseen kohtalaiseen dysplasiaan. Tutkimuksessa 40% aneuploidisista korkean asteen dysplastisista leukoplakiosta ei edennyt maligniin suuntaan neljän vuoden aikana. Toisaalta kohtalaiset dysplasiat aneuploidian yhteydessä saattavat jo vaatia samankaltaista hoitoa kuin suun karsinoma. Diploidiset matalan dysplasia-asteen leukoplakiat eivät näyttäneet malignisoituvan lähes koskaan, joilloin hoidoksi suositellaan seuranta ennemmin kuin toimenpiteisiin ryhtymistä. Erityisesti lieviin ja kohtalaisiin dysplasioihin analyysiä kromosomien instabiliteetista voitaisiin hyödyntää tehdessä päätöksiä muutosten kliinisestä hallinnasta. (Siebers ym. 2013)

#### 4 POHDINTA

Suusyöpävaaraa lisäävien muutosten seuraaminen ei ole helppoa, sillä niiden synty riippuu henkilön ja ympäristön vuorovaikutuksesta, jota on hankala arvioida tai ennustaa. Henkilön reaktioon ympäristön tekijöihin, kuten karsinogeeneihin, esimerkiksi tupakkaan, alkoholiin, betelpähkinään ja papilloomavirukseen, vaikuttavat immuunipuolustuksen vaste ja geneettiset ominaisuudet. (Awadallah ym. 2018) Perinteisesti suun potentiaalisesti maligneja muutoksia ja tiloja on hoidettu kirurgisesti tai laserpoistolla. Nämä tavat ovat kuitenkin vahvasti kytköksissä muutosten uusiutumiseen ilman malignien muutosten riskin poistumista tai edes riskin selkeää vähenemistä. (Nikitakis ym. 2018) Pätevimmäksi keinoksi on todettu suun potentiaalisesti malignien muutosten ja tilojen säännöllinen seuraaminen. Yhteistä ohjetta muutosten seuraamiseen ei ole laajalti käytössä, mutta standardin mukainen toimintamalli voisi olla toimiva niiden potilaiden seuraamiseen, joilla on tai on ollut suusyöpävaaraa lisäävä muutos. (Awadallah ym. 2018)

Eri aneuploidian tutkimiseen käytettyjä metodeja vertailtaessa kuvasytometria vaikuttaa pätevimmältä menetelmältä. Kuvasytometriaa käyttäen on tehty eniten seurantatutkimuksia suusyöpävaaraa lisäävistä muutoksista vertaamalla aneuploidisia ja diploidisia tapauksia ja niiden malignisoitumista. Metodi vaikuttaa sensitiivisimmältä aneuploidisten solujen tutkimisessa ja parhaiten suusyöpää aneuploidian perusteella ennustavalta. Virtausytometrialla ei olla tehty riittävän monta tutkimusta, jotta sen käyttökelpoisuutta voitaisi tilastollisesti perustella suusyövän ennustamisessa. Tämänhetkisen näytön pohjalta voidaan sanoa, että virtausytometrialla ei pystytäkään havaitsemaan kaikkia aneuploidisia soluja, joita esimerkiksi kuvasytometrialla havaitaan. Fluoresenssi *in situ* -hybridisaatiolla päästään aneuploidian havainnoinnissa melko hyviin tuloksiin, jotka eivät kuitenkaan saavuta kuvasytometrian tasoa, mikä sekin johtuu vähäisestä näytön määrästä. Tulevaisuudessa olisi mahdollista löytää nopeasti suurimmassa malignisoitumisvaarassa olevat limakalvomuutokset, jos potilaat pystyttäisiin seulomaan luotettavasti aneuploidian perusteella. Suusyöpävaaraa lisäävästä muutoksesta voitaisiin ottaa näyte esimerkiksi potilaalle miellyttävämällä harjabioptiatekniikalla. Jos näytteessä ilmeneisi aneuploidiaa, voitaisiin jäädä seurantalinjalle potilaan riskitasoon mukautuen. Korkean malignisoitumisriskin potilaat voisivat vaatia seurantaa jopa 3 viikon välein ja hieman matalamman riskin potilaat tarkastettaisiin esimerkiksi 3 kuukauden välein. Tämä vaatisi luotettavat ja laajassa käytössä olevat ploidiamääritysmenetelmät. Potilaat, joilla ei havaita aneuploidiaa, luokiteltaisiin alemman tason riskiryhmiin, jotka eivät vaadi yhtä tiuhaa seuraamista.

DNA-ploidian tutkimusmenetelmien vielä jokseenkin epävarmasta toimivuudesta kertoo esimerkiksi Alaizarin ym. (2017) tekemä meta-analyysi, jossa noin 20 % näytteistä määritettiin diploidisiksi, vaikka ne alkoivatkin myöhemmin ilmentää maligneja muutoksia. Siksi tämänhetkisten metodien kehittäminen sensitiivisemmiksi voisi todistaa ploidiamäärityksen todellisen potentiaalin. (Nikitakis ym. 2018) Nikitakis ym. (2018) nostaa esiin ploidiatutkimustuloksen, joka viittaa kahden geneettisiltä ominaisuuksiltaan poikkeavan muutostyyppin olemassaoloon. Tämä epäily heräsi, kun suun leukoplakioita tutkittaessa 46-60 % diploidisiksi määritetyissä muutoksissa havaittiin lopulta maligneja muutoksia. Siten voidaan todeta, että pelkkä ploidiasetus tuskin on riittävä prognostinen markkeri. Ennemminkin histopatologista määrittystä ja kuvasytometrialla tehtyä ploidiamääritystä voidaan pitää itsenäisinä ja toisiaan täydentävinä tekijöinä. (Nikitakis ym. 2018)

Aneuploidia on hyvä malignien muutosten markkeri suusyöpävaaraa lisäävien muutosten yhteydessä, mutta myös diploidista tulosta on tulkittava varauksella. (Alaizari ym. 2017) Tähän liittyvät osaltaan tutkimusmetodien sensitiivisyyden sekä tiedon riittämättömyys syövän perustavanlaatuisista molekylaarisista mekanismeista. Siebers ym. (2013) tutkimuksen aikana suun levyepiteelin karsinoomaksi kehittyneistä leukoplakioista kuvasytometrialla tutkittaessa 37,5% ja FISH:lla 56,3 % oli määritetty alun perin diploidisiksi. Tätä voidaan selittää osittain tutkimusmetodien havainnoinnin rajallisuudella sekä muutosten heterogeenisyydellä eli sillä, että koepala ei aina edusta koko muutoksen geneettistä epätasapainoa. Useat aiemmat tutkimukset ovat määrittäneet jopa 8-70% hajonnan suusyöpien ploidiamäärityksessä, mutta hyvin sensitiiviset tekniikat osoittavat, että kaikki suusyövät ovat perimmiltään aneuploidisia. (Siebers ym. 2013)

Ploidia-analyysin tulosten käyttökelpoisuutta on kyseenalaistettu muualla maailmassa, koska tämänhetkinen tieto ploidiamäärityksen toimivuudesta on saatu kehittyneissä maissa. Kehittyvissä maissa on erilaiset olot esimerkiksi sosioekonomisen aseman ja ravinnon suhteen. On kuitenkin selvää, että kromosomaalinen epästabiilius on kaikkien syöpien yhteinen piirre, mikä viittaa siihen, että ploidia-analyysiä voitaisi käyttää myös kehittyvissä maissa. Tähän oletukseen tarvitaan vielä vahvistusta, mutta hypoteesi on, että histopatologiseen arviointiin verrattuna objektiivinen ploidia-analyysi voisi hyödyttää kehittyviä maita kustannustehokkuudellaan pitkällä aikavälillä. (Alaizari ym. 2017)

## LÄHDELUETTELO

- Abdel-Salam M, Myall B, Chew K, Silverman S & Greenspan J (1988). Prediction of Malignant Transformation in Oral Epithelial Lesions by Image Cytometry. *Cancer* 62(9):1981-1987
- Alaizari N, Sperandio M, Odell E, Peruzzo D & Al-Maweri S (2017). Meta-analysis of the predictive value of DNA aneuploidy in malignant transformation of oral potentially malignant disorders. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 47(2): 97-103. Doi:10.1111/jop.12603
- Awadallah M, Idle M, Patel K & Kademani D (2018). Management update of potentially premalignant oral epithelial lesions. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology* 125(6):628-636
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R, Torre L, Jemal A (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 68:394-424
- Brouns E, Bloemena E, Belien J, Broeckaert M, Aartman I & van der Waal I (2012). DNA ploidy measurement in oral leukoplakia: Different results between flow and image cytometry. *Oral Oncology* 48(7): 636-640. Doi:10.1016/j.oraloncology.2012.01.013
- Dionne KR, Warnakulasuriya S, Zain RB & Cheong SC (2015). Potentially malignant disorders of the oral cavity: current practice and future directions on the clinic and laboratory. *International Journal of Cancer* 136(3):503-515
- Dunn J, Mackenzie G, Oukrif D, Mosse C, Banks M, Thorpe S ym. (2010). Image cytometry accurately detects DNA ploidy abnormalities and predicts late relapse to high-grade dysplasia and adenocarcinoma in Barrett's oesophagus following photodynamic therapy. *British Journal of Cancer* 102(11), 1608-1617. Doi:10.1038/sj.bjc.6605688
- Ghizoni J, Sperandio M, Lock C, & Odell E (2018). Image cytometry DNA ploidy analysis: correlation between two semi-automated methods. *Oral Diseases* 24(7): 1204-1208. Doi:10.1111/odi.12888
- Giaretti W, Monteghirfo S, Pentenero M, Gandolfo S, Malacarne D & Castagnola P (2013). Chromosomal Instability, DNA Index, Dysplasia, and Subsite in Oral Premalignancy as Intermediate Endpoints of Risk of Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 22(6):1133-1141
- Goetz C, Bonnevier J & Hammerbeck C (2018). *Flow Cytometry Basics for the Non-Expert*. Springer Nature Switzerland <https://doi.org/10.1007/978-3-319-98071-3>
- Lu C (2010). *Chemical cytometry: ultrasensitive analysis of single cells*. Wiley-VCH, Weinheim
- Ma JM, Zhou TJ, Wang R, Shan J, Wu YN & Song XL (2014). Brush biopsy with DNA-image cytometry: a useful and noninvasive method for monitoring malignant transformation of potentially malignant oral disorders. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* 271(12): 3291-3295. Doi:10.1007/s00405-014-2935-4

Mortazavi H, Baharvand M & Mehdipour M (2014). Oral Potentially Malignant Disorders: An overview of more than 20 entities. *Journal of dental research, Dental Clinics, Dental Prospects* 8(1): 6-14. Doi:10.5681/joddd.2014.002

Nikitakis N, Pentenero M, Georgaki M, Poh C, Peterson D, Edwards P, Lingen M, & Sauk J (2018). Molecular markers associated with development and progression of potentially premalignant oral epithelial lesions: Current knowledge and future implications. *Oral and Maxillofacial Pathology*, 125(6), 650-669. Doi:10.1016/j.oooo.2018.03.012

Potapova T & Gorbsky G (2017). The Consequences of Chromosome Segregation Errors in Mitosis and Meiosis. *Biology*, 6(1): 12. Doi:10.3390/biology6010012

Remmerbach T (2013). *Oral Cytology: A Concise Guide*. Springer Science+Business Media, New York

Siebers T, Bergshoeff V, Otte-Höller I, Kremer B, Speel E, van der Laak J (2013). Chromosome instability predicts the progression of premalignant oral lesions. *Oral Oncology* 49(12):1121-28

Tarnanen K, Salo T, Saarilahti K & Pöllänen M (2019). Suusyöpä: Käypä hoito -suositus. Duodecim terveyskirjasto.

[https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=khp00032](https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=khp00032) . Luettu 10.7.2019

Tönnies H (2002). Modern molecular cytogenetic techniques in genetic diagnostics. *TRENDS in Molecular Medicine* 8(6): 246-250

Wilkinson D. G. (1998). *In Situ Hybridization: a practical approach*. Oxford University Press, Oxford

Wu HK, Chen H & Hu PC (2012). Modern Clinical Molecular Techniques; Basic Theories and Clinical Applications of Molecular Flow Cytometry: 323-347. Springer